

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Anna Jordáková

Transkripční faktory řídící periodickou genovou expresi v buněčném cyklu
Schizosaccharomyces pombe

Transcription factors driving periodic gene expression during the fission yeast cell cycle

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Martin Převorovský, Ph.D.

Praha, 2014

Poděkování:

Na prvním místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Martinu Převorovskému, Ph.D. za nesmírnou ochotu, trpělivost a cenné rady při sepisování této práce. Dále patří mé poděkování rodině a přátelům za podporu a povzbuzení.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16. 5. 2014

Anna Jordáková

ABSTRAKT

Poltivá kvasinka *Schizosaccharomyces pombe* hraje důležitou úlohu při objasňování mechanismů regulace buněčného cyklu a při charakterizaci příslušných efektorových molekul. Buněčný cyklus *S. pombe* sestává z dlouhé růstové G2 fáze, která je následována jaderným dělením (M fáze), velmi krátkou G1 fází a replikací DNA (S fáze). Již během S fáze dochází k tvorbě buněčné přepážky. Postup fázemi buněčného cyklu je regulován na mnoha úrovních.

Ačkoli je kvasinka *S. pombe* velmi studovaný modelový organismus, znalost transkripční sítě regulující průchod buněčným cyklem je zatím neúplná. Transkripční faktory jsou velmi důležité regulátory genové exprese, a proto je jejich charakterizace předmětem výzkumu. Doposud bylo identifikováno jen několik transkripčních faktorů, které v průběhu buněčného cyklu regulují oscilující a vzájemně na sobě závislé vlny genové exprese.

Tato práce shrnuje současný stav poznání na poli transkripční regulace periodické genové exprese v buněčném cyklu *S. pombe*.

Klíčová slova: *Schizosaccharomyces pombe*, transkripční faktor, buněčný cyklus, regulace genové exprese, periodicit

ABSTRACT

The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* plays an important role in elucidation of the mechanisms of cell cycle regulation and characterization of the relevant effector molecules involved. The cell cycle of *S. pombe* consists of a prolonged period of growth (G2 phase), which is followed by a nuclear division (M phase), a very short G1 phase and DNA replication (S phase). Already during S phase formation of division septum occurs. Cell cycle progression is regulated at multiple levels.

Although the yeast *S. pombe* is an extensively studied model organism, knowledge of the transcriptional network regulating progression through the cell cycle is still incomplete. Transcription factors are very important regulators of gene expression and therefore their characterization is the subject of research. At the transcriptional level, several key transcription factors have been identified that regulate periodically oscillating and interdependent waves of gene expression during the cell cycle.

This study summarizes the current state of knowledge in the field of the transcriptional regulation of periodic gene expression in the fission yeast cell cycle.

Key words: *Schizosaccharomyces pombe*, transcription factor, cell cycle, regulation of gene expression, periodicity

OBSAH

Seznam použitých zkratk.....	1
1 Úvod.....	2
2 Buněčný cyklus <i>S. pombe</i> , jeho kontrola a regulace.....	3
3 Periodicky exprimované geny v rámci buněčného cyklu	5
4 Transkripční regulace periodicky exprimovaných genů.....	7
4.1 Komplex PBF.....	7
4.1.1 Sep1.....	8
4.1.2 Fkh2	9
4.1.3 Mbx1	9
4.1.4 Role proteinů Plo1 a Clp1	10
4.1.5 Shrnutí.....	10
4.2 Transkripční faktor Ace2	11
4.3 Komplex MBF.....	12
4.3.1 Protein Yox1	14
4.3.2 Funkce proteinů Yox1 a Nrm1 v procesu zachování stability genomu	14
4.4 Proteiny z rodiny CSL.....	16
4.4.1 Houbové proteiny z rodiny CSL	17
4.5 Transkripční faktor Ams2	19
4.6 Transkripční faktory Toe1, Toe2 a Toe3	20
5 Závěr	21
Seznam použité literatury.....	22

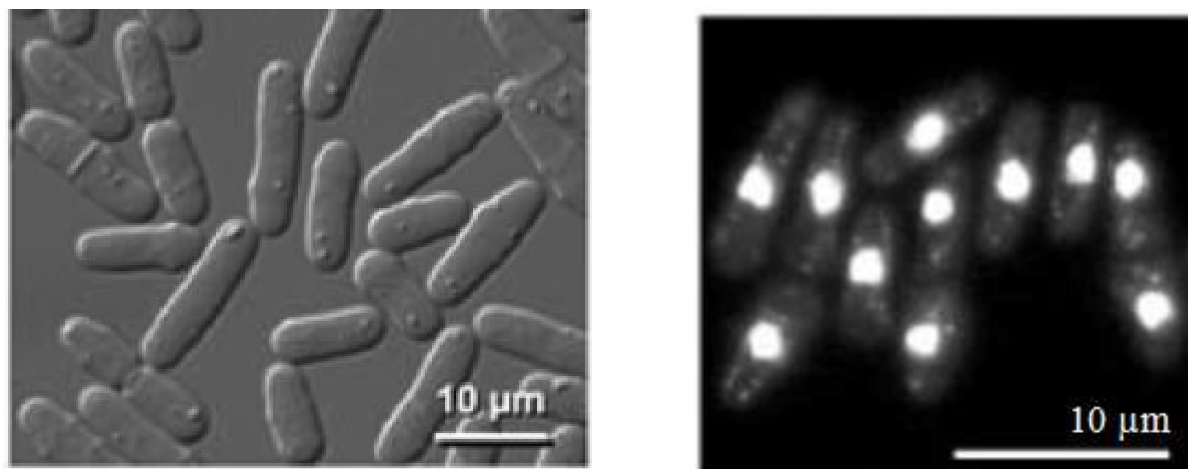
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>adg1⁺, adg2⁺, adg3⁺</i>	„ <i>A</i> cell-dependent genes“
APC/C	„anaphase-promoting complex/cyclosome“
BTD	„beta-trefoil domain“
CBF1	„C-promoter element-binding factor 1“
CSL	„CBF1/RBP-J κ /Suppressor of Hairless/LAG-1“
„cut“ fenotyp	„cell untimely torn“
DSC1	„DNA synthesis control 1“
FHA	„forkhead-associated domain“
FHD	„forkhead-binding domain“
MAP kináza	„mitogen-activated protein kinase“
MBF	„MCB-binding factor“
MCB	„MluI cell-cycle box“
Nrm1	„negative regulator of MBF targets 1“
PBF	„PCB-binding factor“
PCB	„pombe cell-cycle box“
RHR	„Rel-homology region“
SCF	„Skp1-Cullin 1-F-box“
Toe	„transcription factor overexpression elongated“
Yox1	„yeast homeobox 1“

1 ÚVOD

Poltivá kvasinka *Schizosaccharomyces pombe* je významným modelovým organismem pro studium cyklu buněčného dělení. Je také předmětem studia buněčného tvaru, organizace chromatinu a genové exprese. Ačkoliv se jedná o velmi jednoduchého, jednobuněčného houbového eukaryota, má většinu základních vlastností typických pro komplexnější eukaryota. Genom poltivé kvasinky byl osekvenován (Wood *et al.* 2002) a zahrnuje přibližně 5000 genů kódujících proteiny a 1000 genů nekódujících proteiny rozdělených do 3 chromosomů. Fylogeneticky je *S. pombe* řazena do podkmene „Taphrinomycotina“ (Hedges 2002), který spadá do kmene vřeckovýtrusných hub („Ascomycota“). Velmi vzdáleně příbuznou kvasinky *S. pombe* je pučící kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* patřící do podkmene vřeckovýtrusných hub „Saccharomycotina“. Tyto dvě kvasinky se v evoluci oddělily před více než miliardou let (Hedges 2002) a ačkoli sdílejí některé podobné rysy, liší se v životních stylech a regulaci buněčného cyklu.

Schizosaccharomyces pombe je tyčinkovitá kvasinka, která roste apikálně a přehrádečně se dělí (Obrázek 1). Její pravidelný tvar z ní činí velmi užitečný organismus pro identifikaci genů zahrnutých v buněčném cyklu, vzniku a udržování buněčného tvaru (Gómez and Forsburg 2004). Mutanti mohou být jednoduše vizuálně identifikováni – jsou delší, nebo kratší v porovnání s divokým kmenem (buněčně cyklový defekt). Fenotyp dlouhých buněk vzniká v případě, že buňky jsou blokovány nebo zpožděny v progresi buněčného cyklu; pokračují v růstu, ale nedochází k dělení, což vede k prodlužování buněk. Nicméně ne všechny geny, které jsou vyžadovány pro průchod buněčným cyklem, vykazují fenotyp dlouhých buněk, pokud jsou deletovány (Hayles *et al.* 2013).



Obrázek 1: Poltivá kvasinka *Schizosaccharomyces pombe*; vlevo: DIC, upraveno podle (Luo *et al.* 2009); vpravo: barveno DAPI, upraveno podle (Hodson, Bailis, and Forsburg 2003)

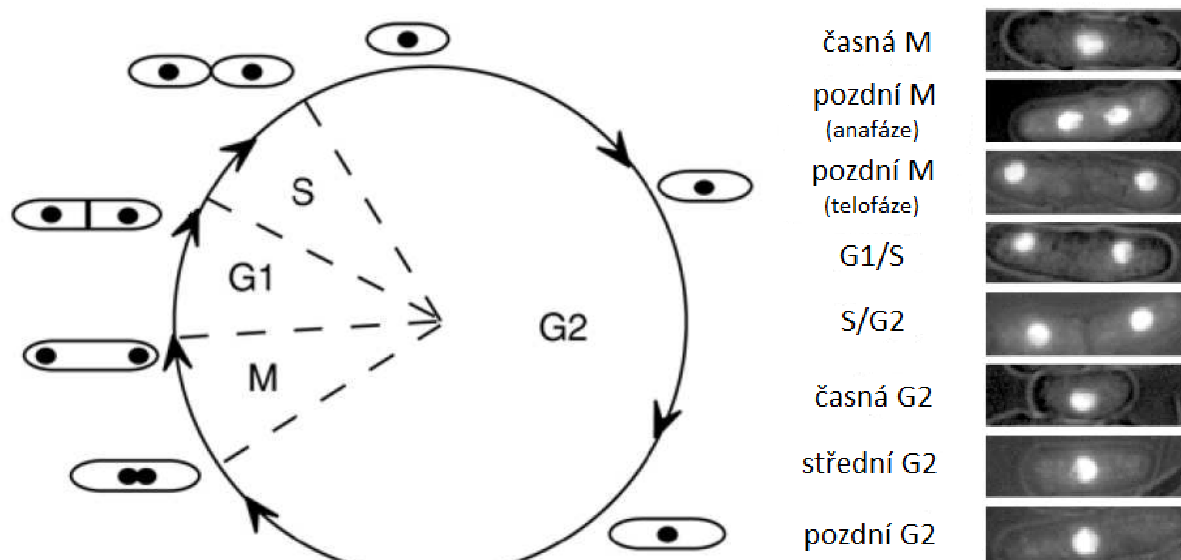
Buněčný cyklus poltivé kvasinky se do jisté míry liší od „učebnicového“ modelu a bude podrobněji popsán v následující kapitole. Kontrola a regulace buněčného cyklu je zajišťována na několika úrovních. Neméně významnou regulací je vedle post-transkripčních a post-translačních regulací jistě regulace na úrovni transkripční.

U kvasinky *S. pombe* je řada genů, které jsou exprimovány konstitutivně, nebo v závislosti na podmínkách prostředí. Byla identifikována i skupina přibližně 500 genů, jejichž exprese se periodicky mění v rámci buněčného cyklu (Rustici *et al.* 2004).

Tato práce si klade za cíl přinést ucelený pohled na doposud charakterizovanou transkripční regulační síť a popsat transkripční faktory či komplexy, které řídí periodickou genovou expresi v buněčném cyklu *Schizosaccharomyces pombe*.

2 BUNĚČNÝ CYKLUS *S. pombe*, JEHO KONTROLA A REGULACE

Buněčný cyklus zahrnující mj. procesy replikace DNA, jaderného a buněčného dělení vede k produkci dvou dceřiných buněk z jedné mateřské buňky. Dělí se typicky do hlavních 4 fází – G1, S, G2 a M. Kvasinka *Schizosaccharomyces pombe* je haploidní během většiny svého životního cyklu a množí se asexuálně skrze mitotický buněčný cyklus (Gómez and Forsburg 2004). Na rozdíl od pučící kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* tráví poltivá kvasinka nejvíce času v G2 fázi buněčného cyklu, která za normálních kultivačních podmínek zabírá až 70% celkového trvání cyklu. V G2 fázi dochází k nárůstu buněčné hmoty. Nachází se zde také hlavní kontrolní bod průběhu buněčného cyklu. U mnoha jiných organismů, například i u *S. cerevisiae*, spadá tento kontrolní bod do G1 fáze. Jakmile dosáhne buňka *S. pombe* kritické velikosti, je aktivována protein kináza Cdc2 (neboli cyklin-dependentní kináza Cdk1), jejíž aktivace vede k přechodu do další fáze buněčného cyklu, do fáze jaderného dělení. V M fázi dochází ke kondenzaci tří replikovaných chromosomů a jejich segregaci k opačným pólům buňky; jaderná obálka však zůstává neporušena. Po jaderném dělení buňka prochází krátkou G1 fází, která je rychle následována S fází, tedy fází, kdy je replikována DNA. Ještě během S fáze dochází k zahájení cytokineze, buněčného dělení. Vzniká dělicí přepážka, která je následně částečně degradována, a dochází k separaci, k fyzickému oddělení dvou dceřiných buněk. Nově vzniklé dceřiné buňky se nacházejí typicky už v časně G2 fázi (Obrázek 2).



Obrázek 2: Buněčný cyklus *S. pombe*; vlevo: upraveno podle (Gómez and Forsburg 2004), vpravo: upraveno podle (Chen *et al.* 2003)

Progrese buněčného cyklu je omezena, pokud dojde k chybné replikaci DNA (replikační checkpoint) nebo pokud je poškozena DNA mimo S fázi (checkpoint kontrolující poškození DNA), a to prostřednictvím evolučně konzervované rodiny kináz – ATM a ATR u savců, Mec1 u *S. cerevisiae* a Rad3 u *S. pombe*. Tyto kinázy fosforylují a tím aktivují checkpointové efektorové kinázy – Chk1 a Chk2 u savců, Rad53 u *S. cerevisiae*, Cds1 a Chk1 u *S. pombe* – které dále fosforylují mnoho cílových proteinů; dochází tak k přenosu signálu, zastavení progrese buněčného cyklu a k podpoře oprav poškození DNA (R. A. M. de Bruin and Wittenberg 2009). V rámci buněčného cyklu existuje mnohem více checkpointů a netýkají se pouze poškození DNA, nicméně pro následující text nejsou relevantní, a proto se jimi blíže nezabývám a ani je nespecifikuji.

Průběh buněčného cyklu je velmi přísně kontrolován. Za důležitý okamžik v regulaci se považuje bod „start“ regulující přechod mezi fázemi G1 a S. Jakmile buňka projde „startem“, musí replikovat svou DNA a dokončit zahájený cyklus buněčného dělení. V poltivé kvasince *S. pombe* byly identifikovány dva geny „startu“: *cdc2⁺* a *cdc10⁺*. Gen *cdc2⁺* je funkčním a sekvenčním homologem genu *CDC28* u *S. cerevisiae*. Kóduje cyklin-dependentní kinázu Cdc2, která může být označena za pilíř kontroly buněčného cyklu. Absence genu *cdc2⁺* vede totiž k zastavení buněčného cyklu na přechodu G1/S i G2/M (Forsburg and Nurse 1991). Přechod mezi fázemi G2 a M je pro poltívou kvasinku *S. pombe* hlavním regulačním bodem, který zabraňuje proběhnutí mitózy před dokončením S fáze a brání tudíž nesprávné

segregaci genetického materiálu. Vstup do mitózy je řízen aktivitou komplexu složeného z cyklin-dependentní kinázy Cdc2 a cyklinu B. Během interfáze je komplex neaktivní, jelikož je fosforylován tyrozin kinázami Wee1 nebo Mik1, které jsou významným negativním regulátorem buněčného cyklu. Na přechodu G2/M jsou kinázy Wee1 a Mik1 inaktivovány, zatímco dochází k aktivaci pozitivního regulátoru buněčného cyklu - fosfatázy Cdc25 - která defosforyluje komplex Cdc2/cyklin B. Dochází tak k jeho aktivaci a buňka vstupuje do M fáze buněčného cyklu (Forsburg and Nurse 1991; Nurse 1990; Perry and Kornbluth 2007).

Mitotický buněčný cyklus může být regulován na mnoha úrovních. V jeho regulaci se uplatňuje mnoho post-translačních procesů: proteinové fosforylace nebo defosforylace, sestřih proteinů, různé interakce mezi proteiny, změna buněčné lokalizace či specifická degradace proteinů a mnoho dalších mechanismů. Regulace na úrovni transkripce je neméně významným mechanismem kontroly průběhu buněčného cyklu (Romanel *et al.* 2012).

3 PERIODICKY EXPRIMOVANÉ GENY V RÁMCI BUNĚČNÉHO CYKLU

Periodická genová exprese je důležitý mechanismus, který umožňuje organizované uskutečňování procesů v rámci buněčného cyklu (Breedon 2003). Správný průběh těchto procesů (např. růst a dělení buněk) je zajišťován různými skupinami genů indukovaných periodicky v určitém stádiu, během kterého jsou vyžadovány pro regulaci právě probíhajících dějů (Futcher 2000). Je třeba, aby tyto geny byly nejen aktivovány ve správný čas, ale aby byly také reprimovány, pokud již nejsou jejich produkty potřeba. Chyby v regulaci genů mohou vést k problémům v buněčné proliferaci a k chorobám, např. rakovině.

Tři nezávislé vědecké skupiny využily DNA microarray analýzu k identifikaci genů *S. pombe*, které jsou periodicky exprimovány jako funkce buněčného cyklu (Oliva *et al.* 2005; Peng *et al.* 2005; Rustici *et al.* 2004). Mezi studiemi panuje pouze částečná shoda s ohledem na počet a identitu periodicky exprimovaných genů. Největší shoda byla pozorována u skupin genů, které oscilují s vysokou amplitudou v průběhu buněčného cyklu. Ve všech studiích je celkem navrženo více než 1300 genů indukovaných periodicky, ale pouze 360 genů je zmíněno v alespoň dvou studiích (Oliva *et al.* 2005). Mezi důvody rozporů lze zařadit kromě použití různých nesystematických názvů pro stejné geny i využití rozdílných analytických metod a výběr souboru genů, které jsou ještě považovány za dostatečně oscilující v rámci

buněčného cyklu. Navíc podle následné metaanalýzy dat navrhly 2 z 3 studií více periodických genů, než mohlo být spolehlivě detekováno z jejich dat (Marguerat *et al.* 2006). Navzdory rozdílnostem jsou tři soubory dat koherentní a podobné kvality, a pokud jsou zkombinovány, poskytují vylepšenou detekci periodicky exprimovaných genů (Marguerat *et al.* 2006).

Přibližně 500 genů může být na základě dostupných dat označeno s dostatečnou spolehlivostí za periodicky exprimované (Marguerat *et al.* 2006). Tyto geny je možno uspořádat do několika skupin podle fáze buněčného cyklu, kdy dochází k jejich expresi. Jsou to skupiny M/G1, S a G2 (Marguerat *et al.* 2006). Do první skupiny, tedy skupiny M/G1, spadají geny, které ovlivňují průběh jaderného a buněčného dělení (např. *cdc15*⁺), buněčné separace (např. *agn1*⁺ a *eng1*⁺ – glykosylhydrolázy), replikace DNA (např. *cdc18*⁺ – iniciace replikace DNA, *pol1*⁺ – DNA polymeráza, *cig2*⁺ – cyklin, *cdc22*⁺ – ribonukleotidreduktáza) a metabolismu DNA. Druhá skupina sdružuje geny exprimované během S fáze, tzn. během replikace DNA. Patří sem zejména geny kódující histonové proteiny. Poslední třetí skupinu G2 tvoří geny, jejichž proteinové produkty ovlivňují buněčný růst, kontrolu buněčného cyklu (např. *cdc2*⁺) a geny odpovědi na buněčný stres.

Periodicita, stejně jako fáze, ve které dochází k maximu exprese, jsou evolučně velmi spoře konzervovány (Jensen *et al.* 2006), ačkoli regulace genové exprese v rámci buněčného cyklu je konzervovanější než regulace jiných procesů – např. meiotická diferenciacie (Mata *et al.* 2002). Odhad počtu periodicky exprimovaných genů, které jsou společné pro *S. pombe* (poltivá kvasinka) a *S. cerevisiae* (pučící kvasinka), je pouze 35. Počet ortologů v rámci periodicky exprimovaných genů sdílených *S. pombe* a člověkem (*Homo sapiens*) je 24. Alespoň 80% genů ze zmíněných 35 genů vykazuje stejné relativní pořadí maxim exprese u *S. pombe* jako u jejich ortologů u *S. cerevisiae*, respektive 40% z 24 genů sdílených poltivou kvasinkou a lidmi (Fernández, Rueda, and Peddada 2012). Pořadí je evolučně konzervováno u 6 genů, které jsou potenciálním základním souborem genů buněčného cyklu (Fernández, Rueda, and Peddada 2012): *ace2*⁺ (gen kódující transkripční faktor), *pol1*⁺ (polo-kináza), *cdc18*⁺ (klíčová složka prereplikačního komplexu), *mik1*⁺ (role při utváření a udržení checkpointu detekujícího poškození DNA (Rhind and Russell 2001)), *hhf1*⁺ a *hta2*⁺ (histony).

4 TRANSKRIPČNÍ REGULACE PERIODICKY EXPRIMOVANÝCH GENŮ

Mnoho genů je regulováno různými kombinacemi transkripčních faktorů. Většina genů transkripčně regulovaných v rámci buněčného cyklu není konzervována v evoluci; základní soubor genů periodicky exprimovaných v poltivé i pučící kvasince se uplatňuje při procesech replikace DNA, jaderného a buněčného dělení (Bähler 2005). Transkripční regulace periodicky exprimovaných genů se poněkud liší u poltivé kvasinky *S. pombe* a pučící kvasinky *S. cerevisiae*. U poltivé kvasinky závisí transkripční regulace jednotlivých buněčných událostí hlavně na jednom transkripčním faktoru nebo komplexu transkripčních faktorů (buněčné procesy mohou být na sobě nezávislé a zároveň mohou probíhat ve stejném čase v rámci buněčného cyklu – například S fáze a cytokineze), zatímco u pučící kvasinky existují páry částečně redundantních transkripčních aktivátorů. Další odlišností je fakt, že doposud známé transkripční faktory netvoří u *S. pombe* plně propojenou cyklickou regulační síť. Navíc se zdá, že post-translační mechanismy jsou u poltivé kvasinky důležitější než regulovaná periodická transkripce v průběhu buněčného cyklu (Bähler 2005).

Bylo prokázáno, že transkripční faktory jsou regulovány sériově: transkripční aktivátory fungující během jednoho stádia buněčného cyklu regulují aktivátory fungující ve stádiu následujícím (Bähler 2005). Transkripční regulací genů v rámci buněčného cyklu je zajištěna jakási úspora, protože geny jsou exprimovány pouze ve chvíli, kdy jsou potřeba (Spellman *et al.* 1998).

V buněčném cyklu *S. pombe* hraje roli několik transkripčních faktorů nebo komplexů, které ovlivňují periodickou genovou expresi. V následující části představím ty, které jsou doposud známé.

4.1 Komplex PBF

PBF je komplex transkripčních faktorů, jehož název je odvozen z anglického „PCB-binding factor“ (PCB-vazebný faktor). Váže se na promotorové sekvence, tzv. PCB boxy („*pombe* cell-cycle box“ – sekvence GNAAC(G/A)), a kontroluje transkripci skupiny genů, které jsou periodicky indukovány na hranici fází M a G1 mitotického cyklu. Produkty těchto genů regulují vznik dělicího vřeténka, začátek anafáze, podílí se na vzniku a správném umístění aktomyozinového prstence a hrají důležitou roli při cytokinezi a buněčné separaci

(Anderson *et al.* 2002). Do zmíněné skupiny genů patří mimo jiné gen *cdc15⁺* kontrolující vznik a umístění aktinového prstence (Fankhauser *et al.* 1995; Utzig, Fankhauser, and Simanis 2000) a *sid2⁺*, který má velký podíl na správném načasování prstencové konstriktce (Balasubramanian *et al.* 1998; Sparks, Morpew, and McCollum 1999).

Složkou PBF komplexu je MADS box protein Mbx1 (Buck *et al.* 2004). Bylo prokázáno, že dva proteiny z rodiny transkripčních faktorů forkhead, Sep1 a Fkh2, jsou vyžadovány pro časově specifickou transkripci genů v průběhu M fáze, která je řízená PCB elementy v promotorových regionech (Buck *et al.* 2004). Nicméně nelze proteiny Sep1 a Fkh2 označit za složky komplexu PBF, protože chybí přímé důkazy (Anderson *et al.* 2002; Bulmer *et al.* 2004). Jelikož je funkce proteinu Mbx1 spjatá s transkripčními faktory Sep1 a Fkh2, uvádím je spolu s ním v této kapitole, ačkoli není jisté, zda jsou přímo složkami komplexu PBF.

4.1.1 Sep1

Jaderný protein Sep1 o velikosti 80 kDa patří do rodiny transkripčních faktorů, které obsahují tzv. forkhead doménu, která je nepostradatelná a postačující pro vazbu na DNA (E. Lai *et al.* 1990). Během M fáze buněčného cyklu aktivuje transkripci mnoha genů; je například vyžadován pro periodickou expresi genu *cdc15⁺* (Fankhauser *et al.* 1995; Ribár, Bánrévi, and Sipiczki 1997; Zilahi *et al.* 2000). Dále kontroluje expresi genů účastnících se septace a separace dvou dceřiných buněk (Alonso-Núñez *et al.* 2005).

Ačkoliv Sep1 reguluje, pozitivně, periodickou transkripci cílových genů, sám gen *sep1⁺* není periodicky transkribován (Rustici *et al.* 2004). Hladina mRNA genu *sep1⁺* je konstantní v průběhu celého buněčného cyklu (Zilahi *et al.* 2000).

Sep1 hraje s dalším transkripčním faktorem Ace2 esenciální roli v kontrole buněčné separace (Sipiczki 2007), samotný gen *sep1⁺* však není nezbytný pro buněčnou viabilitu (Zilahi *et al.* 2000).

Pokud je gen pro transkripční faktor Sep1 deletován, dochází k vážným defektům v buněčné separaci, pozorujeme tzv. hyfální růst, růst ve vláknité formě, a buňky se větví (Alonso-Núñez *et al.* 2005). Je-li deletován cílový gen *cdc15⁺* proteinu Sep1, buňky nejsou schopny vytvářet septa (protein Cdc15 je složkou kontraktilního prstence).

4.1.2 Fkh2

Transkripční faktor Fkh2 je také řazen do proteinové rodiny forkhead. Podobně jako Sep1 ovlivňuje transkripci genů během mitotické fáze (Buck *et al.* 2004; Bulmer *et al.* 2004), avšak působí jako negativní regulátor. Jedná se o 642 aminokyselin dlouhý protein o velikosti 71 kDa. V N-koncové polovině proteinu se nacházejí domény FHD („forkhead-binding domain“) a FHA („forkhead-associated domain“), C-terminální část transkripčního faktoru obsahuje regulační doménu (Buck *et al.* 2004). Na rozdíl od genu *sep1*⁺ je *fkh2*⁺ periodicky exprimován v rámci buněčného cyklu. Ve své promotorové oblasti obsahuje dva PCB boxy. Během každé M fáze je protein Fkh2 periodicky fosforylován. *fkh2*⁺ je neesenciálním genem (Buck *et al.* 2004).

Fkh2 je vyžadován pro správné načasování tvorby septa, pro jeho lokalizaci a následnou kontrakci. Buňky s deletovaným genem *fkh2*⁺ rostou pomaleji než buňky divokého typu, nedochází k úplnému zaškrcení septa nebo se vytváří mnoho přepážek, které mohou být i špatně umístěné. Pro správnou funkci Fkh2 je zapotřebí protein Sep1. Sep1 však funguje i v nepřítomnosti Fkh2 (Buck *et al.* 2004).

4.1.3 Mbx1

Protein Mbx1 je složkou transkripčního komplexu PBF (Buck *et al.* 2004) a váže se na PCB boxy. Patří do rodiny proteinů s konzervovanou MADS box doménou. Funkce proteinu Mbx1 je spjata s funkcí transkripčního faktoru Fkh2. Na rozdíl od proteinů Sep1 a Fkh2 není protein Mbx1 vyžadován absolutně pro periodickou transkripci genů v M fázi. Zjistilo se totiž, že nepřítomnost MADS box proteinu Mbx1 způsobuje nižší expresní amplitudu genů v M fázi (Buck *et al.* 2004).

Tento transkripční faktor podléhá periodické fosforylaci během mitotické fáze (Buck *et al.* 2004). Bylo zjištěno, že pokud je Mbx1 fosforylován prostřednictvím Cdc2, je účinně defosforylován skrze fosfatázu Clp1 (Cdc14-like fosfatáza). Fosforyluje-li však kináza Plo1 protein Mbx1, nedochází k defosforylaci (Papadopoulou *et al.* 2010).

4.1.4 Role proteinů Plo1 a Clp1

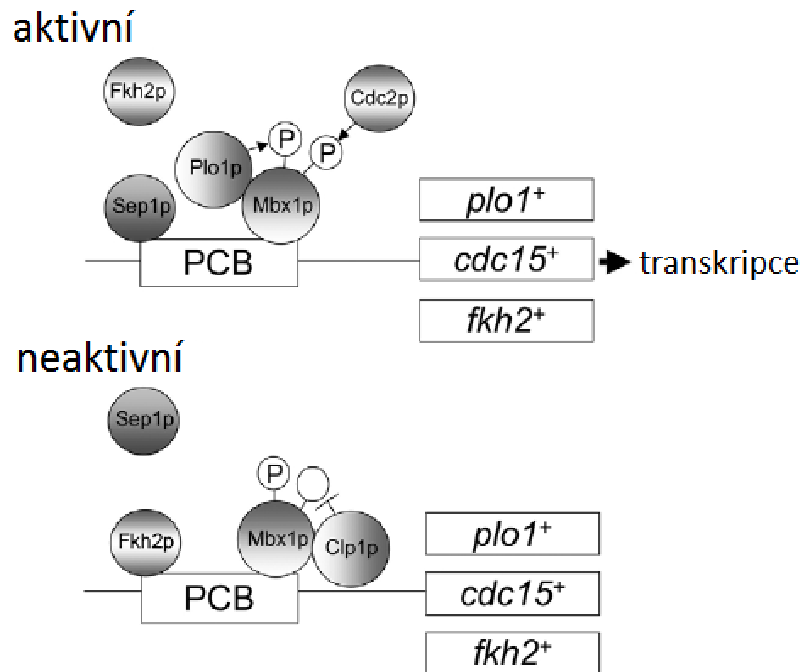
Fkh2 a Mbx1 jsou fosfoproteiny, jejichž fosforylační status se mění v rámci buněčného cyklu. Významnou roli v tomto procesu hraje kináza Plo1 (Anderson *et al.* 2002; Buck *et al.* 2004; Bulmer *et al.* 2004).

Protein Plo1 je u poltivé kvasinky vyžadován pro normální expresi genů na přechodu fází M/G1. Během celého mitotického cyklu interaguje s transkripčním faktorem Mbx1. Pro vzájemnou interakci je nutná kinázová i Polo-box doména Plo1 (Papadopoulou *et al.* 2008). Je to vůbec poprvé, kdy bylo dokázáno, že Polo kináza je schopná vázat a fosforylovat MADS box protein. Katalyticky inaktivující mutace v kinázové doméně proteinu Plo1 znemožní transkripci genů v průběhu M a G1 fází. Plo1 kinázová aktivita kolísá v rámci buněčného cyklu – maximální exprese genu *plo1*⁺ je pozorována v M fázi (Papadopoulou *et al.* 2008).

Represivní roli v kontrole M/G1 genové exprese v poltivé kvasince hraje Cdc14-like fosfatáza Clp1 (Papadopoulou *et al.* 2010). Za zmínku stojí fakt, že u pučící kvasinky má fosfatáza Cdc14 pozitivní, aktivační roli. Clp1 se specificky váže na promotory PBF-regulovaných genů a to i ve specifické fázi v rámci buněčného cyklu. Tím je zabráněno genové expresi mimo M/G1 interval. Schopnost vazby Clp1 (i Plo1) na PCB sekvence je závislá na proteinu Mbx1 (Papadopoulou *et al.* 2010).

4.1.5 Shrnutí

Všechny tři zmíněné transkripční faktory, Sep1, Fkh2 a Mbx1, sdílejí společnou funkci. Obrázek 3 shrnuje dosavadní poznání. Genová exprese je během pozdní M fáze kontrolována skrze dva proteiny z rodiny forkhead, Sep1 a Fkh2, a skrze MADS box protein Mbx1. Fkh2 a Sep1 regulují vazbou na PCB sekvence fázově specifickou genovou expresi – Fkh2 ji reprimuje a Sep1 ji aktivuje. K aktivaci genové exprese je také vyžadována kináza Plo1, která se váže na protein Mbx1 a fosforyluje ho. Fosfatáza Clp1 přispívá k represi genové exprese defosforylací Mbx1, který byl předtím fosforylován kinázou Cdc2. Za zmínku stojí existence zpětnovazebné smyčky, která je dána tím, že geny *plo1*⁺ a *fkh2*⁺ jsou samy transkribovány na přelomu M a G1 fáze pod kontrolou komplexu PBF. Na základě této smyčky může docházet k zesílení indukce nebo k vypnutí genové exprese v tomto stádiu buněčného cyklu (Papadopoulou *et al.* 2010).



Obrázek 3: Regulace genové exprese na přechodu M a G1 fází buněčného cyklu
(upraveno podle (Papadopoulou *et al.* 2010))

4.2 Transkripční faktor Ace2

Protein Ace2 je dalším transkripčním faktorem, který řídí periodickou genovou expresi v buněčném cyklu *S. pombe*. Sám gen *ace2⁺* podléhá periodické transkripci a pro svou expresi vyžaduje protein Sep1, což znamená, že geny Ace2-dependentní jsou zároveň Sep1-dependentní (Alonso-Núñez *et al.* 2005; Rustici *et al.* 2004). Exprese genu *ace2⁺* je také regulována proteinem Fkh2 (Buck *et al.* 2004). V promotorové oblasti genu *ace2⁺* se nachází pět kopií sekvence TGTTTAC, která slouží jako vazebná místa pro proteiny Sep1/Fkh2 z transkripční rodiny forkhead, a také je přítomen PCB element nutný k vazbě proteinu Mbx1 (Alonso-Núñez *et al.* 2005).

Transkripční faktor Ace2 hraje největší roli v G1 fázi buněčného cyklu. Kontroluje expresi genů, které se účastní cytokineze a separace dvou dceřiných buněk. Delecí genu *ace2⁺* dochází k vážným defektům v buněčné separaci, buňky se větví a rostou ve vláknité formě (Alonso-Núñez *et al.* 2005).

Periodicky exprimovaný gen *eng1⁺* je jedním z cílových genů transkripčního faktoru Ace2. Kóduje protein Eng1 s endo- β -1,3-glukanázovou aktivitou nutný pro rozpouštění

primárního septa, jehož hlavní složkou jsou β -1,3-glukany (Martín-Cuadrado *et al.* 2003). Protein Eng1 lokalizuje do míst, kde se formuje septum, a vytváří prstenec kolem této oblasti. Při delecí genu *eng1*⁺ nedochází k tak vážným separačním defektům jako v případě delecí genu *sep1*⁺ nebo *ace2*⁺; dochází ke vzniku skupiny čtyř vzájemně spojených buněk (Alonso-Núñez *et al.* 2005). Další gen, který je regulován transkripčním faktorem Ace2, je gen *agn1*⁺. Kóduje enzym endo- α -1,3-glukanázu, který je společně s proteinem Eng1 důležitý pro úspěšnou buněčnou separaci (Dekker *et al.* 2004). Je-li vytvořen dvojitý mutant *eng1 Δ agn1 Δ* , pozorujeme vážné defekty v buněčné separaci. Za zmínku stojí i geny *mid2*⁺, homolog anilinu nutný pro sestavení septinového prstence (Tasto, Morrell, and Gould 2003), *adg1*⁺, *adg2*⁺ a *adg3*⁺ („AceII-dependent genes“), které jsou také regulovány proteinem Ace2 a fungují během uspořádávání septa nebo buněčné separace.

4.3 Komplex MBF

Komplex transkripčních faktorů MBF („MCB-binding factor“), též zvaný DSC1 (transkripční komplex kontroly syntézy DNA), je vyžadován pro regulaci genů, které mají být transkribovány na přechodu mezi fázemi G1 a S buněčného cyklu a které hrají roli v procesech jako replikace DNA, oprava DNA, kontrola průchodu buněčným cyklem (Maqbool *et al.* 2003; Oliva *et al.* 2005; Peng *et al.* 2005; Rustici *et al.* 2004). Jedná se například o geny *cdc22*⁺, *cdc18*⁺, *cig2*⁺, *cdt1*⁺, *rad21*⁺, *suc22*⁺, *ste6*⁺, *ste9*⁺, *mik1*⁺ a *cdt2*⁺, které jsou přechodně exprimovány na konci G1 fáze; jejich produkty jsou vyžadovány pro úspěšné projití S fáze buněčného cyklu. Komplex MBF se váže do promotorových oblastí genů obsahujících jeden nebo více MCB motivů („MluI cell-cycle box“), které jsou konzervované od kvasinek až po člověka. Jejich typická sekvence je následující: ACGCGT (Bähler 2005). V průběhu buněčného cyklu se buňky dostávají do důležitého regulačního bodu, ve kterém se rozhoduje o jejich dalším osudu. Je to tzv. „start“, kterým když buňky projdou, vstupují do dalšího cyklu buněčného dělení. A právě transkripční aktivace genů ve „startu“ je řízena komplexem MBF. Geny, které jsou transkripčně aktivovány komplexem MBF, jsou nezávislé na transkripčním faktoru Sep1. Dále byla pozorována paralelní funkce (paralelní míněno ve stejné fázi buněčného cyklu) komplexu MBF a transkripčního faktoru Ace2 (Rustici *et al.* 2004).

Komplex MBF se skládá z několika podjednotek. Hlavní komponenty jsou kódovány geny *cdc10*⁺ (Lowndes *et al.* 1992), *res1*⁺ (Tanaka *et al.* 1992) a *res2*⁺ (Miyamoto, Tanaka, and Okayama 1994).

Protein Cdc10 je nedílnou součástí transkripčního komplexu MBF a byla prokázána jeho negativní i pozitivní role v transkripci, která je řízená komplexem MBF (McInerney *et al.* 1995). Cdc10 se na DNA neváže přímo. Vazba komplexu na DNA je zajištěna podjednotkami Res. Proteiny Res1 a Res2 jsou strukturně homologní a obsahují N-terminální domény, které umožňují jejich vazbu na DNA. V centru své molekuly dále mají ankyrinové repetyce. Interakce s proteinem Cdc10 je umožněna skrze jejich C-terminální oblasti (Ayté *et al.* 1995; Zhu *et al.* 1997). Ačkoli jsou proteiny Res1 a Res2 blízce příbuzné, neplní identické funkce. Pokud je deletován gen *res1*⁺, buňky vykazují defekty v rámci mitotického buněčného cyklu (pomalý růst) a jsou-li vystaveny teplotě 23°C nebo 36°C, vede jejich teplotní senzitivita až k zastavení buněk v G1 fázi (Tanaka *et al.* 1992). Situace u buněk s deletovaným genem *res2*⁺ je jiná – neprojevují se žádné zřetelné růstové defekty v průběhu mitotického buněčného cyklu, ale snižuje se schopnost buněk započít premeiotickou syntézu DNA a samotnou meiózu, což poukazuje na funkci proteinu Res2 v procesu sexuální diferenciaci (Miyamoto, Tanaka, and Okayama 1994; Zhu *et al.* 1994). Oba Res proteiny, Res1 a Res2, jsou vyžadovány pro periodickou transkripci genů v G1 fázi. Je zajímavé, že hladina mRNA genů transkribovaných v G1 fázi je v buňkách s deletovaným genem *res1*⁺ konstitutivně snížena a naopak v buňkách s delecí genu *res2*⁺ je hladina mRNA vyšší (Baum, Wuarin, and Nurse 1997). Zdá se tedy, že protein Res1 je nutný pro transkripční aktivaci genů v G1, zatímco protein Res2 je vyžadován pro represi cílových genů mimo G1 fázi buněčného cyklu.

Dříve někteří vědci zastávali názor, že existují dva MBF-like faktory – jeden obsahuje Cdc10 a Res1, druhý Cdc10 a Res2 (Sturm and Okayama 1996; Tahara *et al.* 1998). Nyní se zdá, že existuje jediný heterotetramerní transkripční komplex MBF, který obsahuje homodimer proteinů Cdc10, na který jsou navázány DNA-vazebné proteiny Res1 i Res2 (Ayté, Leis, and DeCaprio 1997; Ayté *et al.* 1995; Whitehall *et al.* 1999; Zhu *et al.* 1997). K regulaci aktivity komplexu MBF tedy pravděpodobně nedochází vyměňováním podjednotek Res, jak bylo původně navrhováno (Whitehall *et al.* 1999).

Doposud jsou známy dva negativní regulační obvody, které zajišťují časovou represi MBF-dependentních genů. Inaktivace transkripce genů, jejichž exprese je spouštěna komplexem MBF, je velmi důležitá a je nutná pro normální průběh buněčného cyklu. Zaprvé, cyklin Cig2, jehož exprese je závislá na komplexu MBF, asociovaný s kinázou Cdc2 inhibuje

aktivitu komplexu MBF v G2 fázi buněčného cyklu – dochází k fosforylaci proteinu Res1 (Ayté *et al.* 2001). Zadrhé, byl identifikován protein Nrm1 („negative regulator of MBF targets 1“), který slouží jako korepresor genů závislých na komplexu MBF (R a M de Bruin *et al.* 2008; Robertus a M de Bruin *et al.* 2006). Samotný gen *nrm1*⁺ je transkripčně regulován komplexem MBF (Robertus a M de Bruin *et al.* 2006).

4.3.1 Protein Yox1

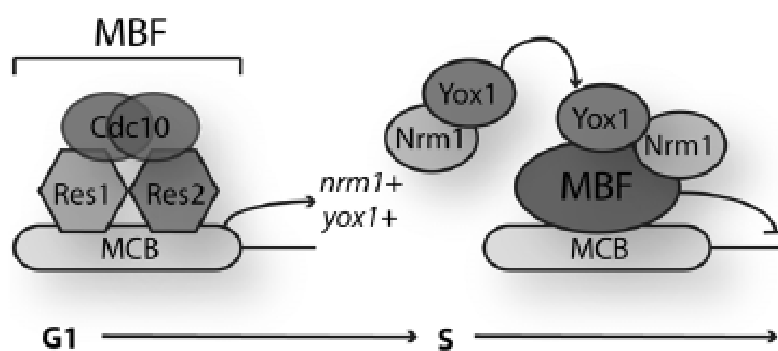
V roce 2009 byla identifikována nová složka komplexu MBF/DSC1 – protein Yox1 z anglického „yeast homeobox 1“ (Aligianni *et al.* 2009). Protein Yox1 je periodicky exprimován během S fáze buněčného cyklu. V zápětí po transkripční aktivaci genu *yox1*⁺ pomocí komplexu MBF se protein Yox1 váže do promotorových oblastí MBF-cílových genů. Na promotory těchto genů se může vázat pouze skrze komplex MBF. Je přítomný v buňkách v nízkých hladinách během MBF-dependentní transkripce a naopak ve vysokých hladinách, když dochází k poklesu MBF-dependentní transkripce, což poukazuje na jeho represivní roli – potlačuje transkripci cílových genů komplexu MBF, tedy inhibuje jejich expresi, mimo G1 a S fázi buněčného cyklu. Pokud je gen pro protein Yox1 deletován, buňky vykazují prodloužený fenotyp a geny, jejichž transkripce je regulována komplexem MBF, jsou neustále exprimovány, tzn. nedochází k represi jejich transkripce. Z toho vyplývá, že protein Yox1 je nezbytný pro buněčně cyklovou regulaci MBF-dependentních genů (Aligianni *et al.* 2009). Vazba proteinu Yox1 na promotorové oblasti genů, jejichž regulace podléhá komplexu MBF, je závislá na proteinu Nrm1. Proteiny Yox1 a Nrm1 fungují ve stejné negativní regulační smyčce a oba jsou vyžadovány pro represi MBF-dependentní transkripce (Caetano, Klier, and Bruin 2011).

4.3.2 Funkce proteinů Yox1 a Nrm1 v procesu zachování stability genomu

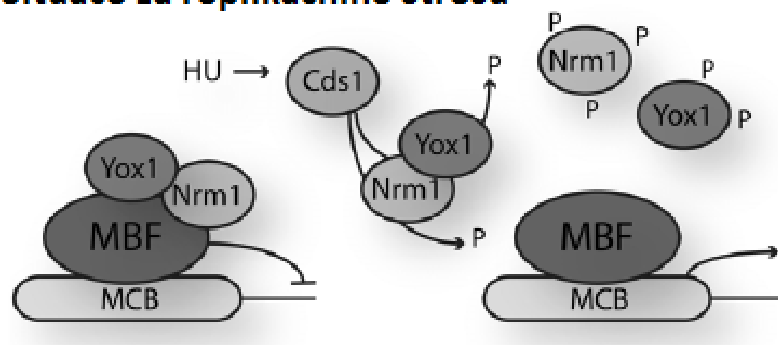
Inaktivace MBF-dependentní transkripce během pozdní S fáze v průběhu mitotického buněčného cyklu je závislá na vazbě korepresorů – proteinů Yox1 a Nrm1. Je-li detekováno poškození vzniklé při replikaci DNA, je aktivován replikační checkpoint. Checkpointová efektorová kináza Cds1 inaktivuje fosforylaci proteiny Yox1 (fosforylace Ser114, Thr115) a Nrm1 (R a M de Bruin *et al.* 2008; Caetano, Klier, and Bruin 2011), které disociují od

ostatních komponent komplexu MBF (Obrázek 4). Dochází tak k derepresi cílových genů komplexu MBF, které jsou tudíž transkribovány i mimo G1 a S fázi. Tato dereprese je zásadní pro životaschopnost buněk v reakci na genotoxický stres. Trvalou indukcí genů regulovaných komplexem MBF se zvyšuje koncentrace deoxynukleotidů, které jsou potřeba pro dokončení replikace DNA, a může tak dojít ke správnému přechodu mezi fázemi S a G2 (Dutta *et al.* 2008). Přestavba transkripčního programu buněčného cyklu vlivem aktivace replikačního checkpointu se pravděpodobně řadí k důležitým mechanismům zamezujícím nestabilitě genomu.

Normální průběh buněčného cyklu



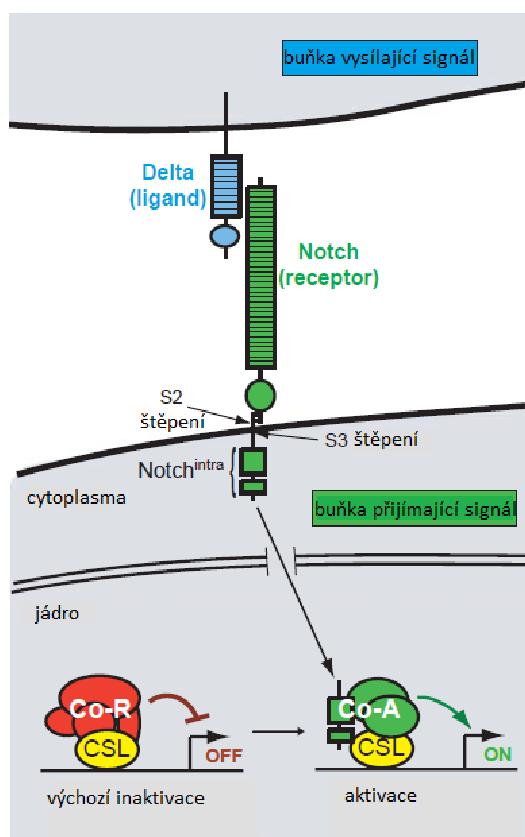
Situace za replikačního stresu



Obrázek 4: Regulace proteinů Yox1 a Nrm1 během buněčného cyklu a v odpovědi na replikační stres; HU – hydroxyurea (inhibitor replikace DNA); (upraveno podle (Caetano, Klier, and Bruin 2011))

4.4 Proteiny z rodiny CSL

Proteiny CSL („CBF1/RBP-J κ /Suppressor of Hairless/LAG-1“) tvoří rodinu transkripčních faktorů, které jsou esenciální pro ontogenetický vývoj živočichů. Fungují jako výkonná složka signální dráhy Notch (Obrázek 5), která reguluje mnoho vývojových procesů – například somitogenezi, neurogenezi, vytváření hranic mezi tkáněmi, diferenciaci krevních buněk (Artavanis-Tsakonas, Rand, and Lake 1999; Weinmaster and Kintner 2003). Nacházejí se převážně nebo výhradně v jádře (Zhou and Hayward 2001).



Obrázek 5: Signální dráha Notch (upraveno podle (E. C. Lai 2004))

Ligand Delta a receptor Notch jsou transmembránové proteiny. Receptor Notch je aktivován ligandem Delta. Tato aktivace vede ke dvěma proteolytickým štěpením receptoru Notch (S2 a S3). Díky štěpení S3 se uvolňuje vnitrobuněčná doména receptoru (Notch^{intra}), která translokuje do jádra. Notch^{intra} aktivuje transkripční faktory CSL. Korepresorový komplex (Co-R), který reprimuje genovou expresi, je vyměněn za koaktivační komplex obsahující Notch^{intra} (Co-A = koaktivační komplex), který spouští transkripci cílových genů signální dráhy Notch. V nepřítomnosti Notch^{intra} proteiny CSL asociují s korepresorovým komplexem, který opět zabrání transkripci Notch-cílových genů.

Geny kódující proteiny rodiny CSL jsou přítomny ve všech genomech studovaných mnohobuněčných živočichů. Proteiny CSL rozeznávají konsensus sekvence GTG(G/A)GAA v promotorových oblastech cílových genů. Dvě ze tří domén proteinů CSL jsou strukturně podobné doménám transkripčních faktorů z rodiny Rel. Vazby na DNA se účastní amino-terminální doména RHR-N („Rel-homology region“) a centrální doména BTD („beta-trefoil domain“). Méně konzervovanou doménou je karboxy-terminální doména RHR-C. Rel-like domény RHR-N a RHR-C jsou obklopeny N-terminální, resp. C-terminální sekvencí (Kovall and Hendrickson 2004).

4.4.1 Houbové proteiny z rodiny CSL

Přítomnost proteinů rodiny CSL není omezena pouze na živočišné organismy a na signální dráhu Notch. Sice chybí u rostlin a u některých nižších eukaryot, ale byly nalezeny homologické geny kódující proteiny rodiny CSL v několika druzích hub, mj. i v genomu poltivé kvasinky *S. pombe*, v organismu, který postrádá signální dráhu Notch (E. C. Lai 2002; Převorovský, Půta, and Folk 2007). Transkripční faktory rodiny CSL tedy hrají roli i při aktivitách nezávislých na signální dráze Notch. Notch-independentní funkce nebyla dosud u živočichů, ani u hub plně objasněna (Barolo *et al.* 2000).

Houbové proteiny rodiny CSL tvoří dvě rozdílné třídy – F1 a F2 (Převorovský, Půta, and Folk 2007). Třída F2 se více podobá živočišné třídě M proteinů CSL, která se dělí na dvě podtřídy – RBP-J κ a RBP-L.

4.4.1.1 Proteiny *Cbf11* a *Cbf12* u *S. pombe*

V poltivé kvasince *S. pombe* byly identifikovány dva paralogy proteinů CSL. Jelikož vykazovaly podobnost se savčími proteiny CBF1 („C-promoter element-binding factor 1“) z rodiny CSL, byly geny kódující proteiny CSL pojmenovány v *S. pombe* jako *cbf11*⁺ a *cbf12*⁺ (Převorovský *et al.* 2009). Kvasinkový protein Cbf11 spadá do třídy F1, zatímco protein Cbf12 do třídy F2. Sekvence proteinů obou houbových tříd (F1, F2) jsou delší než sekvence jejich savčích protějšků. Dlouhá N-terminální část zaujímá průměrně 21,4% (třída F1) a 34,3% (třída F2) celé délky proteinu. Aminokyselinová sekvence N-terminální oblasti je velmi málo konzervovaná a pozorujeme zvýšený výskyt regionů s nízkou komplexitou oproti

centrální části (domény RHR-N, BTD a RHR-C) a C-terminální sekvenci. Poměr délek N-koncových sekvencí tříd F1 a F2 je u hub konzervovaný. N-terminální region houbových proteinů CSL je bohatý na dva důležité typy regulačních sekvencí – cílová místa pro kinázy (fosforylační místa) a PEST motivy – což znamená, že N-terminální regiony mohou hrát důležitou roli v regulaci proteinů CSL (Převorovský *et al.* 2011). Kvasinkové proteiny CSL vyžadují N-terminální sekvence pro jadernou lokalizaci (Oravcová *et al.* 2013). Fosfoprotein Cbf12 podléhá v buňce štěpení; odštěpení části N-koncové oblasti umožňuje *in vitro* vazbu na DNA, která je jí jinak inhibována. Proteolýza Cbf11 nebyla v buňkách pozorována. Cbf12 rozeznává *in vitro* stejné cílové sekvence proteinů CSL jako Cbf11, ale afinita proteinů Cbf11/Cbf12 pro tyto sekvence DNA se velmi liší (Převorovský *et al.* 2011).

Transkripční faktory Cbf11 a Cbf12 fungují protichůdně v mnoha důležitých procesech. Regulují buněčnou adhezi, morfologii kolonií, septaci buněk, separaci dvou dceřiných buněk, koordinaci jaderného a buněčného dělení a podílí se i na udržování genomové ploidie (Převorovský *et al.* 2009). Ani gen *cbf11*⁺, ani gen *cbf12*⁺ není esenciální za normálních růstových podmínek. Kmen s deletovaným genem *cbf11*⁺ vykazuje teplotní senzitivitu – v 19°C pozorujeme výrazně horší růst na pevném médiu oproti divokému kmeni. Měříme-li rychlost růstu v tekuté kultuře při 30°C, buňky s delecí genu *cbf11*⁺ rostou pomaleji v porovnání s buňkami divokého typu a buňkami s delecí genu *cbf12*⁺. Delece genu *cbf11*⁺ dává vzniknout tzv. „cut“ („cell untimely torn“) fenotypu, kdy dochází k nesprávné koordinaci jaderného a buněčného dělení a buněčné jádro je přeškrčeno septem. Dále bylo prokázáno, že protein Cbf11 vystupuje jako negativní regulátor buněčné adheze a protein Cbf12 jako pozitivní regulátor. Ztráta genu *cbf11*⁺ nebo naopak nadprodukce genu *cbf12*⁺ vede k mnoha defektům během buněčného a jaderného dělení, což poukazuje na důležitost udržování správné hladiny proteinů CSL ve zmíněných procesech (Kwon *et al.* 2012; Převorovský *et al.* 2009).

Geny *cbf11*⁺ a *cbf12*⁺ vykazují obecně nízkou hladinu exprese. Gen *cbf11*⁺ je konstantně exprimován v průběhu růstových fází haploidních buněk a podobné množství mRNA je i u diploidních vegetativně rostoucích buněk. Hladina mRNA genu *cbf12*⁺ je nižší než hladina mRNA genu *cbf11*⁺ a vykazuje variabilnější profil, který dosahuje maxim ve stacionární fázi a v meióze (Převorovský *et al.* 2009).

Proteiny Cbf11 a Cbf12 pravděpodobně ovlivňují periodickou transkripci genů v rámci buněčného cyklu *S. pombe*. Deletujeme-li totiž geny kódující houbové proteiny CSL, nebo naopak nadprodukovujeme-li tyto geny, docílíme deregulace přibližně 80 genů, které jsou

za normálních podmínek periodicky exprimovány. Například exprese genu *cgs1*⁺ kódujícího regulační podjednotku proteinkinázy A je přibližně 2krát zvýšena v buňkách s delecí genu *cbf11*⁺ a 1,7krát zvýšena v buňkách s nadprodukovaným genem *cbf12*⁺. U genu kódujícího kinázu *Srk1* je exprese zvýšena 2,4krát v buňkách s delecí genu *cbf11*⁺ a 1,9krát v buňkách s nadprodukovaným genem *cbf12*⁺. Protein *Srk1* je zahrnut v negativní regulaci přechodu G2/M mitotického buněčného cyklu. Ke zvýšení exprese dochází dále u genu *pyp2*⁺ kódujícího fosfatázu, která je negativním regulátorem MAP kinázy *Sty1*. Naproti tomu je například exprese genu *eng1*⁺ 1,5krát resp. 2,2krát snížena v buňkách s deletovaným genem *cbf11*⁺ resp. s nadprodukovaným genem *cbf12*⁺ (nepublikovaná data).

4.5 Transkripční faktor Ams2

Exprese histonových genů je regulována v závislosti na buněčném cyklu. Histony jsou esenciální pro sestavení a vznik nukleosomů v průběhu replikace DNA. Protein Ams2, člen rodiny transkripčních faktorů GATA (Chen *et al.* 2003), reguluje periodickou transkripci histonových genů během S fáze buněčného cyklu (Takayama and Takahashi 2007). Množství proteinu Ams2 kolísá v rámci buněčného cyklu; k maximu jeho exprese dochází během S fáze (Chen *et al.* 2003).

Po proběhnutí S fáze je nutné zabránit nepotřebné genové expresi histonů během G2 a M fáze. Bylo prokázáno, že stechiometrický poměr histonů H2A/H2B a H3/H4 je důležitý pro normální průběh replikace a segregace chromosomů, a protože má ektopická exprese histonových genů negativní vliv na tyto procesy, je regulace exprese histonových genů velmi důležitým mechanismem (Meeks-Wagner and Hartwell 1986). Zabránění nežádoucí expresi genů kódujících histony se děje prostřednictvím dvou vysoce konzervovaných E3 ubikvitin ligáz, které napomáhají degradaci proteinu Ams2. Nepřítomnost proteinu Ams2 v G1 fázi zřejmě hraje roli v represii transkripce histonových genů v této fázi buněčného cyklu (Trickey, Fujimitsu, and Yamano 2013). Jedná se o E3 ubikvitin ligázy SCF a APC/C, které jsou regulované v rámci buněčného cyklu (Deshaies 1999; Peters 1998). E3 ubikvitin ligáza APC/C („anaphase-promoting complex/cyclosome“) je katalyticky aktivní od metafáze do konce G1 fáze. Pro aktivaci vyžaduje fosforylaci svých podjednotek a vazbu koaktivátorů – Cdc20/Slp1 a Cdh1/Ste9. Rozeznává tzv. KEN-boxy, které se nacházejí na C-konci proteinu Ams2 a jsou nutné pro jeho degradaci (Trickey, Fujimitsu, and Yamano 2013). E3 ubikvitin ligáza SCF („Skp1-Cullin 1-F-box“), která obsahuje protein Pof3 jako F-box protein, je

katalyticky aktivní během celého buněčného cyklu. Načasování destrukce substrátu je však regulováno fosforylačním statusem substrátu – ubikvitin ligáza SCF se váže pouze na fosforylovaný substrát. Zmíněné E3 ligázy mohou být aktivní v různých časech během buněčného cyklu a tedy doplňovat jedna druhou.

Proteolýza Ams2 hraje roli v udržení histonové homeostáze a integrity genomu; je koordinována exprese histonů a replikace DNA (Takayama *et al.* 2010; Trickey, Fujimitsu, and Yamano 2013).

4.6 Transkripční faktory Toe1, Toe2 a Toe3

Díky metodě systematické nadprodukce byly nalezeny další tři transkripční faktory, které se podílí na řízení genové exprese v rámci buněčného cyklu. Byly nazvány Toe1, Toe2 a Toe3 z anglického „transcription factor overexpression elongated“, protože byly-li tyto transkripční faktory nadprodukovány, došlo k defektům v průběhu buněčného cyklu – buňky byly prodloužené (Vachon *et al.* 2013).

Transkripční faktor Toe1 aktivuje geny fungující v dráze recyklace pyrimidinů a hraje roli v regulaci buněčného cyklu – ektopická exprese genu *toe1*⁺ způsobuje zdržení buněk v G1 fázi. Nadprodukcí proteinu Toe2 bylo dosaženo defektů ve formaci septa, která se často uspořádávala v buňce podélně. Bylo identifikováno několik cílových genů transkripčního faktoru Toe2, které hrají roli v septaci buněk *S. pombe*. Poslední zmíněný transkripční faktor Toe3 reguluje geny zodpovědné za správný průběh segregace jader (Vachon *et al.* 2013).

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo shrnout současný stav poznání týkající se transkripční regulace periodicky exprimovaných genů v buněčném cyklu poltivé kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*. Na rozdíl od velmi vzdáleně příbuzné pučící kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* není pro poltivou kvasinku vytvořena komplexní síť regulace, protože byla pouze částečně charakterizována, a doposud identifikované transkripční faktory netvoří plně propojenou cyklickou regulační síť.

Regulace transkripce genů během fází M a G1 je řízena dvěma transkripčními faktory z rodiny forkhead, proteiny Sep1 a Fkh2, a jedním transkripčním faktorem z rodiny MADS box, Mbx1. Často se tyto tři transkripční faktory vyskytují pod sjednocujícím názvem, a sice transkripční komplex PBF. Transkripční faktor Ace2 regulovaný proteinem Sep1, je vyžadován pro regulaci genů, které mají být transkribovány na přechodu mezi fázemi G1 a S buněčného cyklu a které hrají roli v cytokinezi a buněčné separaci. Vedle proteinu Ace2 hraje na přechodu G1/S buněčného cyklu významnou roli komplex transkripčních faktorů MBF, který se skládá minimálně ze tří podjednotek – proteinu Cdc10, Res1 a Res2. Komplex MBF řídí expresi genů vyžadovaných pro replikaci DNA, opravy DNA a kontrolu průchodu buněčným cyklem. Mimo tyto hlavní transkripční regulátory periodické genové exprese v rámci buněčného cyklu byly identifikovány další transkripční faktory – například Ams2, proteiny Toe, transkripční faktory z rodiny CSL – ale ještě mnoho dalších regulátorů čeká na identifikaci, jak vyplývá z výsledků bioinformatických analýz dat o genové expresi v rámci buněčného cyklu.

Porozumění regulační síti buněčného cyklu je velmi důležité, a proto jsou transkripční faktory v centru zájmu jak základního výzkumu, tak i medicínsky orientovaných oborů. A poltivá kvasinka *Schizosaccharomyces pombe* je skvělým nástrojem pro jejich charakterizaci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aligianni, Sofia, Daniel H Lackner, Steffi Klier, Gabriella Rustici, Brian T Wilhelm, Samuel Marguerat, Sandra Codlin, Alvis Brazma, Robertus A M de Bruin, and Jürg Bähler. 2009. "The Fission Yeast Homeodomain Protein Yox1p Binds to MBF and Confines MBF-Dependent Cell-Cycle Transcription to G1-S via Negative Feedback." *PLoS genetics* 5(8): e1000626.
- Alonso-Núñez, Maria Luisa, Hanbing An, Ana Belén Martín-Cuadrado, Sapna Mehta, Claudia Petit, Matthias Sipiczki, Francisco del Rey, Katheleen L Gould, and Carlos R Vázquez de Aldana. 2005. "Ace2p Controls the Expression of Genes Required for Cell Separation in *Schizosaccharomyces pombe*." *Molecular biology of the cell* 16(4): 2003–17.
- Anderson, Mark, Szu Shien Ng, Vanessa Marchesi, Fiona H MacIver, Frances E Stevens, Tracy Riddell, David M Glover, Iain M Hagan, and Christopher J McInerney. 2002. "Plo1(+) Regulates Gene Transcription at the M-G(1) Interval during the Fission Yeast Mitotic Cell Cycle." *The EMBO journal* 21(21): 5745–55.
- Artavanis-Tsakonas, S., M D Rand, and R J Lake. 1999. "Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development." *Science (New York, N.Y.)* 284(5415): 770–76.
- Ayté, J, J F Leis, and J a DeCaprio. 1997. "The Fission Yeast Protein p73^{res2} Is an Essential Component of the Mitotic MBF Complex and a Master Regulator of Meiosis." *Molecular and cellular biology* 17(11): 6246–54.
- Ayté, J, J F Leis, A Herrera, E Tang, H Yang, and J a DeCaprio. 1995. "The *Schizosaccharomyces pombe* MBF Complex Requires Heterodimerization for Entry into S Phase." *Molecular and cellular biology* 15(5): 2589–99.
- Ayté, J, C Schweitzer, P Zarzov, P Nurse, and J a DeCaprio. 2001. "Feedback Regulation of the MBF Transcription Factor by Cyclin Cig2." *Nature cell biology* 3(12): 1043–50.
- Bähler, Jürg. 2005. "Cell-Cycle Control of Gene Expression in Budding and Fission Yeast." *Annual review of genetics* 39: 69–94.
- Balasubramanian, M K, D McCollum, L Chang, K C Wong, N I Naqvi, X He, S Sazer, and K L Gould. 1998. "Isolation and Characterization of New Fission Yeast Cytokinesis Mutants." *Genetics* 149(3): 1265–75.
- Barolo, Scott, Richard G Walker, Andrey D Polyanovsky, Gina Freschi, Thomas Keil, and James W Posakony. 2000. "A Notch-Independent Activity of Suppressor of Hairless Is Required for Normal Mechanoreceptor Physiology." *Cell* 103(6): 957–69.
- Baum, B, J Wuarin, and P Nurse. 1997. "Control of S-Phase Periodic Transcription in the Fission Yeast Mitotic Cycle." *The EMBO journal* 16(15): 4676–88.
- Breeden, Linda L. 2003. "Periodic Transcription: A Cycle within a Cycle." *Current biology* □: CB 13(1): R31–8.

- De Bruin, R a M, T I Kalashnikova, A Aslanian, J Wohlschlegel, C Chahwan, J R Yates, P Russell, and C Wittenberg. 2008. "DNA Replication Checkpoint Promotes G1-S Transcription by Inactivating the MBF Repressor Nrm1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(32): 11230–35.
- De Bruin, Robertus a M, Tatyana I Kalashnikova, Charly Chahwan, W Hayes McDonald, James Wohlschlegel, John Yates, Paul Russell, and Curt Wittenberg. 2006. "Constraining G1-Specific Transcription to Late G1 Phase: The MBF-Associated Corepressor Nrm1 Acts via Negative Feedback." *Molecular cell* 23(4): 483–96.
- De Bruin, Robertus A M, and Curt Wittenberg. 2009. "All Eukaryotes: Before Turning off G1-S Transcription, Please Check Your DNA." *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8(2): 214–17.
- Buck, Vicky, Szu Shien Ng, Ana Belen Ruiz-Garcia, Kyriaki Papadopoulou, Saeeda Bhatti, Jane M Samuel, Mark Anderson, Jonathan B A Millar, and Christopher J McInerny. 2004. "Fkh2p and Sep1p Regulate Mitotic Gene Transcription in Fission Yeast." *Journal of cell science* 117(Pt 23): 5623–32.
- Bulmer, Richard, Aline Pic-Taylor, Simon K Whitehall, Kate A Martin, Jonathan B A Millar, Janet Quinn, and Brian A Morgan. 2004. "The Forkhead Transcription Factor Fkh2 Regulates the Cell Division Cycle of *Schizosaccharomyces pombe*." *Eukaryotic cell* 3(4): 944–54.
- Caetano, Catia, Steffi Klier, and RAM de Bruin. 2011. "Phosphorylation of the MBF Repressor Yox1p by the DNA Replication Checkpoint Keeps the G1/S Cell-Cycle Transcriptional Program Active." *PloS one* 6(2): e17211.
- Dekker, Nick, Dave Speijer, Christian H Grün, Marlene van den Berg, Annett de Haan, and Frans Hochstenbach. 2004. "Role of the Alpha-Glucanase Agn1p in Fission-Yeast Cell Separation." *Molecular biology of the cell* 15(8): 3903–14.
- Deshaies, R J. 1999. "SCF and Cullin/Ring H2-Based Ubiquitin Ligases." *Annual review of cell and developmental biology* 15(9): 435–67.
- Dutta, Chaitali, Prasanta K Patel, Adam Rosebrock, Anna Oliva, Janet Leatherwood, and Nicholas Rhind. 2008. "The DNA Replication Checkpoint Directly Regulates MBF-Dependent G1/S Transcription." *Molecular and cellular biology* 28(19): 5977–85.
- Fankhauser, C, A Reymond, L Cerutti, S Utzig, K Hofmann, and V Simanis. 1995. "The *S. pombe cdc15* Gene Is a Key Element in the Reorganization of F-Actin at Mitosis." *Cell* 82(3): 435–44.
- Fernández, Miguel A, Cristina Rueda, and Shyamal D Peddada. 2012. "Identification of a Core Set of Signature Cell Cycle Genes Whose Relative Order of Time to Peak Expression Is Conserved across Species." *Nucleic acids research* 40(7): 2823–32.
- Forsburg, S L, and P Nurse. 1991. "Cell Cycle Regulation in the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*." *Annual review of cell biology* 7: 227–56.

- Futcher, B. 2000. "Microarrays and Cell Cycle Transcription in Yeast." *Current opinion in cell biology* 12(6): 710–15.
- Gómez, Eliana B, and Susan L Forsburg. 2004. "Analysis of the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe* Cell Cycle." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 241: 93–111.
- Hayles, Jacqueline, Valerie Wood, Linda Jeffery, Kwang-Lae Hoe, Dong-Uk Kim, Han-Oh Park, Silvia Salas-Pino, Christian Heinricher, and Paul Nurse. 2013. "A Genome-Wide Resource of Cell Cycle and Cell Shape Genes of Fission Yeast." *Open biology* 3(5): 130053.
- Hedges, S Blair. 2002. "The Origin and Evolution of Model Organisms." *Nature reviews. Genetics* 3(11): 838–49.
- Hodson, Jeffrey a., Julie M Bailis, and Susan L Forsburg. 2003. "Efficient Labeling of Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe* with Thymidine and BUdR." *Nucleic acids research* 31(21): e134.
- Chen, Ee Sin, Shigeaki Saitoh, Mitsuhiro Yanagida, and Kohta Takahashi. 2003. "A Cell Cycle-Regulated GATA Factor Promotes Centromeric Localization of CENP-A in Fission Yeast." *Molecular cell* 11(1): 175–87.
- Jensen, Lars Juhl, Thomas Skøt Jensen, Ulrik de Lichtenberg, Søren Brunak, and Peer Bork. 2006. "Co-Evolution of Transcriptional and Post-Translational Cell-Cycle Regulation." *Nature* 443(7111): 594–97.
- Kovall, Rhett a, and Wayne a Hendrickson. 2004. "Crystal Structure of the Nuclear Effector of Notch Signaling, CSL, Bound to DNA." *The EMBO journal* 23(17): 3441–51.
- Kwon, Eun-joo Gina, Amy Laderoute, Kate Chatfield-Reed, Lianne Vachon, Jim Karagiannis, and Gordon Chua. 2012. "Deciphering the Transcriptional-Regulatory Network of Flocculation in *Schizosaccharomyces pombe*." *PLoS genetics* 8(12): e1003104.
- Lai, E, V R Prezioso, E Smith, O Litvin, R H Costa, and J E Darnell. 1990. "HNF-3A, a Hepatocyte-Enriched Transcription Factor of Novel Structure Is Regulated Transcriptionally." *Genes & development* 4(8): 1427–36.
- Lai, Eric C. 2002. "Keeping a Good Pathway down: Transcriptional Repression of Notch Pathway Target Genes by CSL Proteins." *EMBO reports* 3(9): 840–45.
- Lai, Eric C. 2004. "Notch Signaling: Control of Cell Communication and Cell Fate." *Development (Cambridge, England)* 131(5): 965–73.
- Lowndes, N F, C J McInerney, A L Johnson, P A Fantes, and L H Johnston. 1992. "Control of DNA Synthesis Genes in Fission Yeast by the Cell-Cycle Gene *cdc10⁺*." *Nature* 355(6359): 449–53.

- Luo, Jun, Yasuhiro Matsuo, Galina Gulis, Haylee Hinz, Jana Patton-Vogt, and Stevan Marcus. 2009. "Phosphatidylethanolamine Is Required for Normal Cell Morphology and Cytokinesis in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Eukaryotic cell* 8(5): 790–99.
- Maqbool, Z, P J Kersey, P a Fantes, and C J McInerny. 2003. "MCB-Mediated Regulation of Cell Cycle-Specific *cdc22*⁺ Transcription in Fission Yeast." *Molecular genetics and genomics* □: MGG 269(6): 765–75.
- Marguerat, Samuel, Thomas S Jensen, Ulrik de Lichtenberg, Brian T Wilhelm, Lars J Jensen, and Jürg Bähler. 2006. "The More the Merrier: Comparative Analysis of Microarray Studies on Cell Cycle-Regulated Genes in Fission Yeast." *Yeast (Chichester, England)* 23(4): 261–77.
- Martín-Cuadrado, Ana Belén, Encarnación Dueñas, Matthias Sipiczki, Carlos R Vázquez de Aldana, and Francisco del Rey. 2003. "The Endo-Beta-1,3-Glucanase *eng1p* Is Required for Dissolution of the Primary Septum during Cell Separation in *Schizosaccharomyces pombe*." *Journal of cell science* 116(Pt 9): 1689–98.
- Mata, Juan, Rachel Lyne, Gavin Burns, and Jürg Bähler. 2002. "The Transcriptional Program of Meiosis and Sporulation in Fission Yeast." *Nature genetics* 32(1): 143–47.
- McInerny, C J, P J Kersey, J Creanor, and P a Fantes. 1995. "Positive and Negative Roles for *cdc10* in Cell Cycle Gene Expression." *Nucleic acids research* 23(23): 4761–68.
- Meeks-Wagner, D, and L H Hartwell. 1986. "Normal Stoichiometry of Histone Dimer Sets Is Necessary for High Fidelity of Mitotic Chromosome Transmission." *Cell* 44(1): 43–52.
- Miyamoto, M, K Tanaka, and H Okayama. 1994. "*res2*⁺, a New Member of the *cdc10*⁺/*SWI4* Family, Controls the 'Start' of Mitotic and Meiotic Cycles in Fission Yeast." *The EMBO journal* 13(8): 1873–80.
- Nurse, P. 1990. "Universal Control Mechanism Regulating Onset of M-Phase." *Nature* 344(6266): 503–8.
- Oliva, Anna, Adam Rosebrock, Francisco Ferrezuelo, Saumyadipta Pyne, Haiying Chen, Steve Skiena, Bruce Futcher, and Janet Leatherwood. 2005. "The Cell Cycle-Regulated Genes of *Schizosaccharomyces pombe*." *PLoS biology* 3(7): e225.
- Oravcová, Martina, Mikoláš Teska, František Půta, Petr Folk, and Martin Převorovský. 2013. "Fission Yeast CSL Proteins Function as Transcription Factors." *PloS one* 8(3): e59435.
- Papadopoulou, Kyriaki, Jun-song Chen, Emma Mead, Anna Feoktistova, Claudia Petit, Monica Agarwal, Mohammed Jamal, Asrar Malik, Adonis Spanos, Steven G Sedgwick, Jim Karagiannis, Mohan K Balasubramanian, Kathleen L Gould, and Christopher J McInerny. 2010. "Regulation of Cell Cycle-Specific Gene Expression in Fission Yeast by the Cdc14p-like Phosphatase Clp1p." *Journal of cell science* 123(Pt 24): 4374–81.
- Papadopoulou, Kyriaki, Szu Shien Ng, Hiroyuki Ohkura, Marco Geymonat, Steven G Sedgwick, and Christopher J McInerny. 2008. "Regulation of Gene Expression during

- M-G1-Phase in Fission Yeast through Plo1p and Forkhead Transcription Factors.” *Journal of cell science* 121(Pt 1): 38–47.
- Peng, Xu, R Krishna Murthy Karuturi, Lance D Miller, Kui Lin, Yonghui Jia, Pinar Kondu, Long Wang, Lim-soon Wong, Edison T Liu, Mohan K Balasubramanian, and Jianhua Liu. 2005. “Identification of Cell Cycle-Regulated Genes in Fission Yeast.” *Molecular biology of the cell* 16(3): 1026–42.
- Perry, Jennifer a, and Sally Kornbluth. 2007. “Cdc25 and Wee1: Analogous Opposites?” *Cell division* 2: 12.
- Peters, J M. 1998. “SCF and APC: The Yin and Yang of Cell Cycle Regulated Proteolysis.” *Current opinion in cell biology* 10(6): 759–68.
- Převorovský, Martin, Tomáš Groušl, Jana Staňurová, Jan Ryneš, Wolfgang Nellen, František Půta, and Petr Folk. 2009. “Cbf11 and Cbf12, the Fission Yeast CSL Proteins, Play Opposing Roles in Cell Adhesion and Coordination of Cell and Nuclear Division.” *Experimental cell research* 315(8): 1533–47.
- Převorovský, Martin, František Půta, and Petr Folk. 2007. “Fungal CSL Transcription Factors.” *BMC genomics* 8: 233.
- Převorovský, Martin, Sophie R Atkinson, Martina Ptáčková, Janel R McLean, Kathleen Gould, Petr Folk, František Půta, and Jürg Bähler. 2011. “N-Termini of Fungal CSL Transcription Factors Are Disordered, Enriched in Regulatory Motifs and Inhibit DNA Binding in Fission Yeast.” *PloS one* 6(8): e23650.
- Rhind, Nicholas, and Paul Russell. 2001. “Roles of the Mitotic Inhibitors Wee1 and Mik1 in the G(2) DNA Damage and Replication Checkpoints.” *Molecular and cellular biology* 21(5): 1499–1508.
- Ribár, B, A Bánrévi, and M Sipiczki. 1997. “*sep1*⁺ Encodes a Transcription-Factor Homologue of the HNF-3/forkhead DNA-Binding-Domain Family in *Schizosaccharomyces pombe*.” *Gene* 202(1-2): 1–5.
- Romanel, Alessandro, Lars Juhl Jensen, Luca Cardelli, and Attila Csikász-Nagy. 2012. “Transcriptional Regulation Is a Major Controller of Cell Cycle Transition Dynamics.” *PloS one* 7(1): e29716.
- Rustici, Gabriella, Juan Mata, Katja Kivinen, Pietro Lió, Christopher J Penkett, Gavin Burns, Jacqueline Hayles, Alvis Brazma, Paul Nurse, and Jürg Bähler. 2004. “Periodic Gene Expression Program of the Fission Yeast Cell Cycle.” *Nature genetics* 36(8): 809–17.
- Sipiczki, Matthias. 2007. “Splitting of the Fission Yeast Septum.” *FEMS yeast research* 7(6): 761–70.
- Sparks, C a, M Morpew, and D McCollum. 1999. “Sid2p, a Spindle Pole Body Kinase That Regulates the Onset of Cytokinesis.” *The Journal of cell biology* 146(4): 777–90.

- Spellman, P T, G Sherlock, M Q Zhang, V R Iyer, K Anders, M B Eisen, P O Brown, D Botstein, and B Futcher. 1998. "Comprehensive Identification of Cell Cycle-Regulated Genes of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Microarray Hybridization." *Molecular biology of the cell* 9(12): 3273–97.
- Sturm, S, and H Okayama. 1996. "Domains Determining the Functional Distinction of the Fission Yeast Cell Cycle 'Start' Molecules Res1 and Res2." *Molecular biology of the cell* 7(12): 1967–76.
- Tahara, S, K Tanaka, Y Yuasa, and H Okayama. 1998. "Functional Domains of *rep2*, a Transcriptional Activator Subunit for Res2-Cdc10, Controlling the Cell Cycle 'Start'." *Molecular biology of the cell* 9(6): 1577–88.
- Takayama, Yuko, Yasmine M Mamnun, Michelle Trickey, Susheela Dhut, Fumie Masuda, Hiroyuki Yamano, Takashi Toda, and Shigeaki Saitoh. 2010. "Hsk1- and SCF(Pof3)-Dependent Proteolysis of *S. pombe* Ams2 Ensures Histone Homeostasis and Centromere Function." *Developmental cell* 18(3): 385–96.
- Takayama, Yuko, and Kohta Takahashi. 2007. "Differential Regulation of Repeated Histone Genes during the Fission Yeast Cell Cycle." *Nucleic acids research* 35(10): 3223–37.
- Tanaka, K, K Okazaki, N Okazaki, T Ueda, A Sugiyama, H Nojima, and H Okayama. 1992. "A New *cdc* Gene Required for S Phase Entry of *Schizosaccharomyces pombe* Encodes a Protein Similar to the *cdc10*⁺ and *SWI4* Gene Products." *The EMBO journal* 11(13): 4923–32.
- Tasto, Joseph J, Jennifer L Morrell, and Kathleen L Gould. 2003. "An Anillin Homologue, Mid2p, Acts during Fission Yeast Cytokinesis to Organize the Septin Ring and Promote Cell Separation." *The Journal of cell biology* 160(7): 1093–1103.
- Trickey, Michelle, Kazuyuki Fujimitsu, and Hiroyuki Yamano. 2013. "Anaphase-Promoting Complex/cyclosome-Mediated Proteolysis of Ams2 in the G1 Phase Ensures the Coupling of Histone Gene Expression to DNA Replication in Fission Yeast." *The Journal of biological chemistry* 288(2): 928–37.
- Utzig, S, C Fankhauser, and V Simanis. 2000. "Periodic Accumulation of *cdc15* mRNA Is Not Necessary for Septation in *Schizosaccharomyces pombe*." *Journal of molecular biology* 302(4): 751–59.
- Vachon, Lianne, Justin Wood, Eun-Joo Gina Kwon, Amy Laderoute, Kate Chatfield-Reed, Jim Karagiannis, and Gordon Chua. 2013. "Functional Characterization of Fission Yeast Transcription Factors by Overexpression Analysis." *Genetics* 194(4): 873–84.
- Weinmaster, Gerry, and Chris Kintner. 2003. "Modulation of Notch Signaling during Somiteogenesis." *Annual review of cell and developmental biology* 19: 367–95.
- Whitehall, S, P Stacey, K Dawson, and N Jones. 1999. "Cell Cycle-Regulated Transcription in Fission Yeast: Cdc10-Res Protein Interactions during the Cell Cycle and Domains Required for Regulated Transcription." *Molecular biology of the cell* 10(11): 3705–15.

- Wood, V, R Gwilliam, M-A Rajandream, M Lyne, R Lyne, A Stewart, J Sgouros, N Peat, J Hayles, S Baker, D Basham, S Bowman, K Brooks, D Brown, S Brown, T Chillingworth, C Churcher, M Collins, R Connor, A Cronin, P Davis, T Feltwell, A Fraser, S Gentles, A Goble, N Hamlin, D Harris, J Hidalgo, G Hodgson, S Holroyd, T Hornsby, S Howarth, E J Huckle, S Hunt, K Jagels, K James, L Jones, M Jones, S Leather, S McDonald, J McLean, P Mooney, S Moule, K Mungall, L Murphy, D Niblett, C Odell, K Oliver, S O'Neil, D Pearson, M A Quail, E Rabinowitsch, K Rutherford, S Rutter, D Saunders, K Seeger, S Sharp, J Skelton, M Simmonds, R Squares, S Squares, K Stevens, K Taylor, R G Taylor, A Tivey, S Walsh, T Warren, S Whitehead, J Woodward, G Volckaert, R Aert, J Robben, B Grymonprez, I Weltjens, E Vanstreels, M Rieger, M Schäfer, S Müller-Auer, C Gabel, M Fuchs, A Düsterhöft, C Fritz, E Holzer, D Moestl, H Hilbert, K Borzym, I Langer, A Beck, H Lehrach, R Reinhardt, T M Pohl, P Eger, W Zimmermann, H Wedler, R Wambutt, B Purnelle, A Goffeau, E Cadieu, S Dréano, S Gloux, V Lelaure, S Mottier, F Galibert, S J Aves, Z Xiang, C Hunt, K Moore, S M Hurst, M Lucas, M Rochet, C Gaillardin, V A Tallada, A Garzon, G Thode, R R Daga, L Cruzado, J Jimenez, M Sánchez, F del Rey, J Benito, A Domínguez, J L Revuelta, S Moreno, J Armstrong, S L Forsburg, L Cerutti, T Lowe, W R McCombie, I Paulsen, J Potashkin, G V Shpakovski, D Ussery, B G Barrell, P Nurse, and L Cerrutti. 2002. "The Genome Sequence of *Schizosaccharomyces pombe*." *Nature* 415(6874): 871–80.
- Zhou, S, and S Diane Hayward. 2001. "Nuclear Localization of CBF1 Is Regulated by Interactions with the SMRT Corepressor Complex." *Molecular and cellular biology* 21(18): 6222–32.
- Zhu, Y, T Takeda, K Nasmyth, and N Jones. 1994. "*pct1*⁺, Which Encodes a New DNA-Binding Partner of p85^{*cdc10*}, Is Required for Meiosis in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Genes & development* 8(8): 885–98.
- Zhu, Y, T Takeda, S Whitehall, N Peat, and N Jones. 1997. "Functional Characterization of the Fission Yeast Start-Specific Transcription Factor Res2." *The EMBO journal* 16(5): 1023–34.
- Zilahi, E, E Salimova, V Simanis, and Matthias Sipiczki. 2000. "The *S. pombe sep1* Gene Encodes a Nuclear Protein That Is Required for Periodic Expression of the *cdc15* Gene." *FEBS letters* 481(2): 105–8.